

## 明細書

## 生物学的被検体の高速検出方法

## 技術分野

- 5 本発明は、被検体の生物学的検出方法に関し、より具体的には凝集反応を利用する被検体の検出方法に関する。

## 背景技術

- ラテックスまたは赤血球等に抗原または抗体を感作しておき、生物学的流体中の被検体例えば、タンパク質または特定の有機物質、を介する凝集反応を利用して被検体を検出する
- 10 る方法は、当該技術分野で周知である。このようなラテックスとしては、例えば、ポリスチレンラテックスが広く用いられており、粒径、粒子表面上の官能基（カルボキシル基等）に基づく各種要因が被検体の検出速度もしくは検出感度（被検体以外の物質の非特異吸着等）にいかなる影響を及ぼすか、等についても検討されている（例えば、日本臨床検査自動化学会会誌第12巻、第2号 121-124, 1987、参照。）。
- 15 しかし、検出速度に大きな影響を及ぼすラテックス粒子の被検体を介する凝集は、拡散律速であるのでかなりの時間がかかっていた。そのため、ラテックス粒子中に磁性粒子を担持させ、磁力によってラテックス粒子の凝集もしくは沈殿速度を高めるような試みがなされてきた（例えば、J. Applied Polymer Science Vol. 50, 765-776, 1993、参照。）。
- 20 なお、前者の文献に記載されているようなポリスチレンラテックス粒子等は非特異凝集を起こしやすく、分散安定性に若干劣る場合もある。また、かような粒子表面への被検体以外の夾雑タンパク質の非特異吸着も起こりやすい。そのため、本発明者の一部は、生物学的試料中の被検体を検出するための量子ドットとして、例えば、ポリエチレングリコール（以下、PEGと略記もする。）（または、ポリ（エチレンオキシド））鎖が、半導体超微
- 25 粒子を内包する微小粒子の表面を覆う（または、水性溶液中でモビリティの高いPEGが複数のブラシ状構造をとる。）複合粒子を提供した（国際公開（WO）第02/056020号パンフレット（第16～17頁）、参照。）。しかし、このような量子ドットは夾雑タンパク質の非特異吸着を防止するだけでなく、一般に数百ナノメートルまでの粒径をもち、しかもモビリティの高いPEGが表面に存在するため水性溶液中で極めて安定な分散状態

をもたらすので、凝集反応を利用する被検体の迅速な検出系で用いるのに、必ずしも適するものとは考えられなかった。

#### 発明の開示

本発明の目的は、生物学的試料中の夾雑タンパク質の非特異吸着を排除するとともに、  
5 磁力等を用いることなく、迅速な被検体の検出方法を提供することにある。

本発明者らは、例えば、国際公開（WO）第02/056020号パンフレットに記載されているようなモビリティの高いPEGまたはその他の親水性ポリマー鎖が表面に存在する微小粒子が、各種タンパク質等を含有する水溶液中で荷電性基を有し、そしてかような基が荷電した状態に置かれる場合、該微小粒子がある一定のタンパク質との静電相互作用により瞬時に凝集することを見出した。

また、例えば、被検体としてアビジンを他のタンパク質と一緒に含有する水溶液中では、該微小粒子が、表面に生物学的な特異結合を形成する構成員の一方の構成員（例えば、ビオチン誘導体の残基）を担持する場合、他の構成員であるアビジンも上記のある一定のタンパク質とともに瞬時の微小粒子の凝集に関与する。こうして形成された凝集物を、前記  
15 の生物学的な特異結合は開裂しないが、静電相互作用による結合を開裂させる条件下に置く（例えば、イオン強度を高める）と、現に、生物学的な特異結合のみを選択的に残存させる（すなわち、特異結合のみを介した凝集物だけが選択的に残存しうる）ことを見出した。以上の静電的相互作用および生物学的な特異結合による凝集物の形成、その後の静電相互作用による凝集体のみの選択的な解凝集の総時間は極めて短時間でよいことが確認  
20 できた。

本発明はかかる知見に基づいて完成されたものである。したがって、本発明によれば、水性溶液中に分散したポリマーをベースとする微小粒子の凝集反応を利用する該溶液中の被検体の検出方法であって、

（a） 該微小粒子が荷電性基を担持した反復単位を含有するポリマー鎖セグメントをコアとし、そして非イオン性の親水性ポリマー鎖または該親水性ポリマー鎖セグメントを前記のコア上の複数ブラシ状構造物またはシエルとし、かつ、該親水性ポリマー鎖の自由末端の少なくとも一部に被検体と生物学的な特異結合を形成する構成員の一員の残基が共有結合されており、そして

（b） 凝集反応を、荷電性基が荷電した状態の微小粒子が被検体を介して凝集し得る条

件下で行い、次いで該微小粒子の凝集物における微小粒子間の生物学的な特異結合は開裂しないが、静電的相互作用による結合は開裂しうる条件下で該凝集物を処理し、

(c) 工程 (b) の処理後に残存する凝集物の存在を被検体の存在の指標とする、ことを特徴とする検出方法。

- 5 本発明の検出方法によれば、生物学的試料中の夾雑タンパク質による影響を殆ど受けることなく、高感度かつ、迅速な被検体（タンパク質、その他の作用物質）の検出が可能になる。

#### 図面の簡単な説明

- 10 図 1 は、本発明に従う、静電相互作用による結合の形成 (a) と、生物学的な特異結合の選択的な残存 (b) についての概念図である。

図 2 は、水溶液中での C d S 内包微小粒子のエネルギー移動度に対する N a C l の添加効果を示すグラフである。○は T e x R S A 0.3 0 M N a C l 添加を、そして●は、T e x S A 0.3 0 M N a C l 添加を示す。

#### 発明を実施するための最良の形態

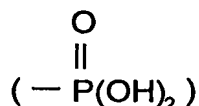
- 15 本発明の方法によって検出できる被検体は、生物学的な特異結合に関与しうる化合物または分子であれば如何なる物質であってもよくタンパク質や多糖のような高分子物質、低分子量のハプテンとなり得る作用物質（各種医薬、毒物等）を初め、ホルモン、神経ペプチド等のすべてを包含する。このような化合物としては天然物もしくはその修飾体、半合成化合物、および化学合成物等を挙げることができる。このような化合物を含む試料とし
- 20 ては、生物学的流体、例えば、血液、尿、唾液またはこれらの希釈溶液もしくは濃縮溶液を包含する処理液、等、ならびに作用物質の生物学的または化学的変換の反応混合物等を含有する水溶液、が挙げられる。

- 本発明に関しては、これらの生物学的流体および化学合成混合物を含有する水溶液をも生物学的流体または試料とも称し、また該試料に含まれる作用物質、ハプテン、抗原、抗体、糖、レクチン、ホルモン、神経伝達物質、作用物質もしくはホルモン等の受容体タン
- 25 パク質を生物学的被検体または、単に、被検体とも称する。

したがって、本発明にいう、ポリマーをベースとする微小粒子の凝集反応を行う水性溶液としては、上記の生物学的試料を典型例として挙げることができる。本発明に従えば、被検体がハプテン、抗原、低分子ペプチドホルモンであっても、それらに対応する抗体ま

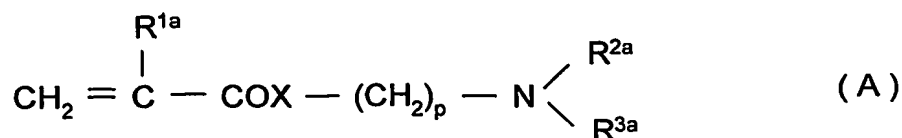
たは受容体タンパク質等に対して多官能性を有する限り、本発明における被検体となり得る。理論に拘束されるものでないが、試料中に存在しうる夾雑タンパク質等が静電的相互作用を介して微小粒子に結合する際に、これらの被検体も該夾雑タンパク質と一緒に移動することができ、しかも被検体は微小粒子に担持された生物学的な特異結合を形成する構成員の一員の残基に結合しうる。勿論、被検体がタンパク質であるときも、該タンパク質は他の夾雑タンパク質と一緒に移動するとともに前記構成員の一員の残基に結合しうる。限定されるものでないが、かかる構成員の一員は、抗原もしくはハプテンと抗体、ホルモンもしくは神経伝達物質とそれに対する受容体タンパク質、基質と酵素等の構成員のペアのいずれかであることができ、タンパク質には糖タンパク質、リポタンパク質等も含まれる。

ポリマーをベースとする微小粒子は、換言すれば、ポリマーを主体とする微小粒子であり、後述する無機物の超微粒子を初め、微小粒子それ自体の安定性および本発明の目的に悪影響を及ぼさないいかなる物質が含まれていてもよいことを意味する。かような微小粒子は、荷電性基を担持した反復単位を含有する。これらの荷電性基は、ポリマー主鎖およびポリマーの側鎖のいずれにも存在することができる。また、「荷電性」は、水性溶液中のいずれかの条件下、例えば、適当なpH下に置かれると、電荷を有しうる性質を意味する。本発明にいう荷電性基の具体的なものとしては、三級アミノ基、二級アミノ基、カルボキシル基 ( $-\text{COOH}$ )、スルホ基 ( $-\text{SO}_3\text{H}$ ) およびホスホノ基



が挙げられる。なお、ポリマー主鎖に存在しうる荷電性基は、三級アミノ基および二級アミノ基である。三級アミノ基および二級アミノ基は、2種の基が同一のポリマー鎖セグメントに存在してもよく、また、他のカルボキシル基、スルホ基およびホスホノ基も同一のポリマー鎖セグメントに2種以上が存在することもできる。

このような荷電性基を担持した反復単位を含有するポリマー鎖セグメントは、例えば、ポリマー主鎖に二級アミノ基を有するポリ(アルキレンアミン)の他に、ポリマー側鎖にアミノ基を有するものとしては、ポリマー鎖が、一般式(A)：

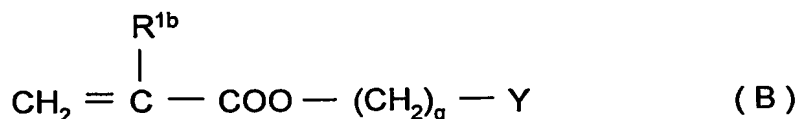


[式中、 $\text{R}^{1a}$ は水素原子または $\text{C}_{1-6}$ アルキル基を表し、 $\text{R}^{2a}$ および $\text{R}^{3a}$ は独立して $\text{C}_{1-6}$ アルキル基を表すか、または $\text{R}^{2a}$ および $\text{R}^{3a}$ は、それらが結合する窒素原子と一緒にな

5 もしくは6員の複素環を形成してもよく、

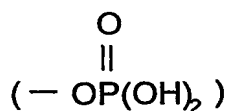
Xは $-\text{O}-$ または $-\text{NH}-$ を表し、そして

pは2～6の整数である。] で表されるモノマー、または一般式 (B) :



[式中、 $\text{R}^{1b}$ は水素原子または $\text{C}_{1-6}$ アルキル基を表し、Yはカルボキシル( $-\text{COOH}$ )、

10 スルホ( $-\text{SO}_3\text{H}$ )、オキシスルホ( $-\text{OSO}_3\text{H}$ ) またはオキシホスホノ



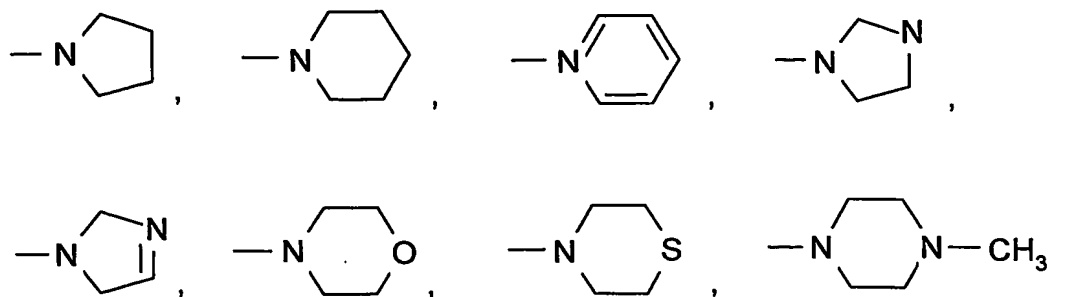
を表し、そして

qは0～4の整数であるが、qが0の場合には、Yは水素原子を表す。] で表されるモノマ  
ーに由来するか；あるいはポリ (リシン)、ポリ (アスパラギン酸3- $\omega$ -N,N-ジ $\text{C}_{1-6}$   
15  $\text{C}_{1-6}$ アルキルアミノ- $\text{C}_{2-4}$ アルキル)、ポリ (グルタミン酸4- $\omega$ -N,N-ジ $\text{C}_{1-6}$ アルキ  
ルアミノ- $\text{C}_{2-4}$ アルキル)、ポリ (アスパラギン酸) およびポリ (グルタミン酸) からな  
る群より選ばれるポリ (アミノ酸誘導体) に由来するものが挙げられる。

上記の各式中の置換基について、同一の定義がなされている場合は、特記しない限り、  
各式間で同一の意味を表すことを意図している。例えば、 $\text{C}_{1-6}$ アルキル基は、共通して、  
20 炭素原子を1～6個有する直鎖もしくは分岐アルキルであり、例えば、メチル、エチル、  
n-プロピル、iso-プロピル、n-ブチル、sec.-ブチル、tert.-ブチル、n-  
ペンチル、n-ヘキシル等を包含する。

一般式 (A) において、 $\text{R}^{2a}$ および $\text{R}^{2b}$ は、それらが結合する窒素原子と一緒になって、

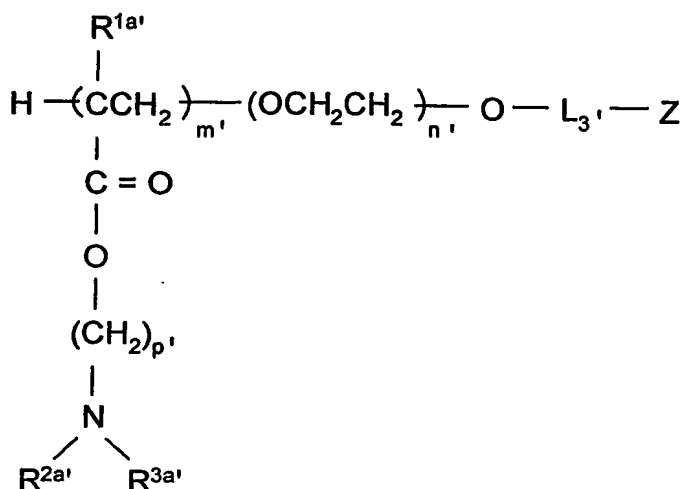
5 もしくは6員の複素環を形成する場合は、限定されるものでないが、次のものを挙げる  
ことができる：



他方、ポリマーをベースとする微小粒子中の非イオン性の親水性ポリマー鎖は、ポリエ  
チレングリコール、ポリ（ビニルアルコール）、ポリ（ビニルピロリドン）およびポリ（N,  
N—ジメチルアクリルアミド）からなる群より選ばれるポリマーに由来するものを挙げる  
ことができる。これらのうち、本発明の目的上、ポリエチレングリコール由来のポリマー  
鎖が特に好ましい。以上にいう、「ポリマーに由来する」とは、ポリマーの両末端または片  
末端における水素原子等の小原子もしくはヒドロキシ基等の小分子が除去されるにすぎな  
いことを意味する。

親水性ポリマー鎖または該ポリマー鎖セグメントと荷電性基を担持した反復単位を含有  
するポリマー鎖または該ポリマー鎖セグメントは、これらの2種もしくは3種の鎖を、当  
業者に周知のいかなる連結手段により連結したものであってもよく、例えば、脱水縮合、  
重付加、スペーサーを介する連結、または、一方のポリマー鎖を予め形成しておき、その  
後、該ポリマー鎖の片末端で、他のポリマー鎖をモノマーから重合成長させて、本発明で  
使用できる微小粒子形成用のブロック共重合体を提供できる。限定されるものでないが、  
このような共重合体の典型的なものとしては、例えば、Kataoka et al., *Macromolecules*,  
1999, 32, 6892—6894に記載の下記一般式（A—1）で表されるものを挙  
げることができる。

一般式（A—1）：



(A-1)

上式中、 $R^{1a'}$  は水素原子または $C_{1-6}$ アルキル基を表し、 $R^{2a'}$  および $R^{3a'}$  は独立して $C_{1-6}$ アルキル基を表し、

$L_{3'}$  は $C_{1-6}$ アルキレンまたは原子価結合を表し、

- 5  $Z$  は水素原子、水酸基、カルボキシル基、アミノ基またはアルデヒド基を表し、 $Z$  が水素原子であるときは $L_{3'}$  が原子価結合であり、

$m'$  は1～10,000の整数であり、

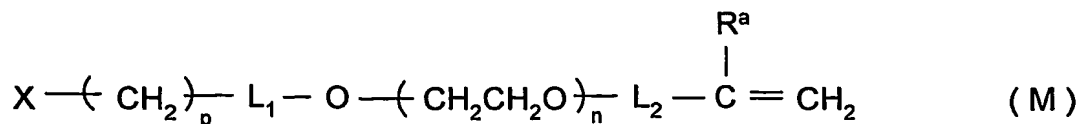
$n'$  は10～20,000の整数であり、そして

$p'$  は2～6の整数である。

- 10 また、親水性ポリマー鎖がポリエチレングリコールに由来し、荷電性基を担持した反復単位を含有するポリマー鎖がポリ（アミノ酸誘導体）に由来するブロック共重合体としては、例えば、特許第2690276号公報に記載のもの、またはそれらの修飾された共重合体を挙げるができる。

- 15 また、親水性ポリマー鎖セグメントに対応するマクロモノマーを予め用意しておき、該マクロモノマーと、荷電性基を担持したモノマーとを、必要により、架橋剤および／またはエチレン性重合性基を有する希釈モノマーとともに共重合させ、こうして得られたランダム共重合体も、本発明に従う微小粒子を形成するのに使用できる。限定されるものでないが、マクロモノマーとして、下記一般式 (M) で表されるポリ（エチレングリコール）マクロモノマーを使用する場合を例に、本発明で使用する微小粒子の形成について説明
- 20 する。

一般式 (M) :



式中、Xは水素原子、 $-\text{COOM}$ 基（ここで、Mは水素原子または有機基を表す）、 $-\text{CHR}^1\text{R}^2$ （ここで、 $\text{R}^1$ および $\text{R}^2$ は、独立して、 $\text{C}_{1-6}$ アルキルオキシ基、フェニルオキシ基もしくはフェニル- $\text{C}_{1-3}$ アルキルオキシ基を表すか、または $\text{R}^1$ および $\text{R}^2$ は一緒になって $-\text{OCHR}'-\text{CH}_2\text{O}-$ であって、 $\text{R}'$ が水素原子もしくは $\text{C}_{1-6}$ アルキル基である基を表す）または $-\text{CH}=\text{O}$ を表し、

R<sup>a</sup>は水素原子またはC<sub>1-6</sub>アルキル基を表し、

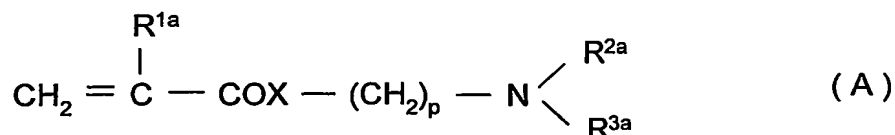
L<sub>1</sub>はメチレン基またはカルボニル基を表し、

10  $L_2$ はカルボニル基、 $C_{1-3}$ アルキレン基または $C_{1-3}$ アルキルフェニレン基を表し、

nは2～10,000の整数であり、そして

pは1～5の整数である。なお、C<sub>1-6</sub>アルキルオキシ、フェニル-C<sub>1-3</sub>アルキルオキシ、C<sub>1-3</sub>アルキルフェニレンにおけるアルキル部分は、上記のC<sub>1-6</sub>アルキルの説明または具体例に従って、理解できる。C<sub>1-3</sub>アルキレンとしては、-CH<sub>2</sub>-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-, -CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>-等が例示できる。

一般式 (M) で表されるマクロモノマーは、例えば、一般式 (A) :



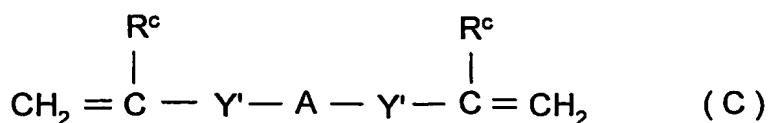
[式中、R<sup>1a</sup>は水素原子またはC<sub>1-6</sub>アルキル基を表し、R<sup>2a</sup>およびR<sup>3a</sup>は独立してC<sub>1-6</sub>アルキル基を表すか、またはR<sup>2a</sup>およびR<sup>3a</sup>は、それらが結合する窒素原子と一緒になって、さらなる窒素原子1もしくは2個、酸素または硫黄原子1個を含んでもよい5もしくは6員の複素環を形成してもよく、

Xは—O—または—NH—を表し、そして

pは2～6の整数である。] で表されるモノマーと、

必要により、架橋剤、例えば、一般式 (C) :





〔式中、 $\text{R}^\circ$ は水素原子または $\text{C}_{1-6}$ アルキル基を表し、 $\text{Y}'$ は原子価結合、カルボニル基または $-\text{NH}-$ を表し、 $\text{A}$ はフェニレン基、 $-(\text{CH}_2)_r-$ （ここで、 $r$ は1～4の整数である）または $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O})_s-$ （ここで、 $s$ は1～4の整数である）を表す〕で表さ

5 れる架橋剤と、さらに必要により、エチレン性重合性基を有する希釈モノマー：スチレン、  
（メタ）アクリル酸メチル、（メタ）アクリル酸ブチル、（メタ）アクリル酸2-エチルヘキシル、（メタ）アクリル酸アミド、メタクリル酸2-ヒドロキシエチル、イソプレン、ブタジエン等から選ばれるモノマー、を、水性媒体中、当該技術分野でそれ自体既知の懸濁重合を行うことにより、目的とする微小粒子を形成できる。

10 好ましい態様は架橋剤を用いる架橋ポリマーであり、その製造には必須の、一般式（M）のマクロモノマーと一般式（A）のモノマーと一般式（C）の架橋剤は、これらの合計重量が100重量%となるように組み合わせられることを前提条件として、重量基準で、それぞれ、好ましくは10～70重量%と30～90重量%と0.1～20重量%であり、より好ましくは一般式（A）のマクロモノマーが10～50重量%、一般式（A）のモノマー  
15 が40～80重量%、一般式（C）の架橋剤が0.2～10重量%であり、特に好ましくは、それぞれ、15～30重量%、50～60重量%、および0.5～1重量%であることができる。また、希釈モノマーは、以上のモノマーの総重量部100に対し、0.5～40重量部とすることができる。

これらのモノマーの共重合反応は、ラジカル重合が起こる条件下、例えば、溶媒として、  
20 必要により水混和性の有機溶媒、メタノール、エタノールが存在してもよい水、好ましくは水単独で、開始剤として、過硫酸カリウム、過硫酸ナトリウム、過硫酸アンモニウム、4,4'-アゾビス-4-シアノバレリアン酸等を用いて、必要により加熱下に行うことができる。反応体の混合溶液は、不活性ガス（例えば、窒素、アルゴン等）により脱気を行った状態で、激しく攪拌しながら反応を行えばよい。反応は、反応混合物のアリコートをし、  
25 例えばガスクロマトグラフィーで分析し、未反応のモノマーが消失するまで行う。こうして、一般的には、架橋ポリマーが微粒子（またはビーズ）状で得られる。このような微粒子の粒径は、反応において、（a）のマクロモノマーと（b）のコモノマーと（c）の架橋

剤の使用割合を選ぶことにより、また、(a)のマクロモノマーのPEGの分子量を選ぶことにより、粒径を約30nm～約10数 $\mu$ mにまたはそれ以上にも調整することができる。したがって、本発明の微粒子はミクロスフェアと称することもできる。通常、モノマーの配合比を増加させることにより大きい粒径の微粒子を形成できる。他方、架橋剤の使用割合を変化させることにより、網目の疎密を調整できる。また、希釈剤モノマーとして、例えば、メタクリル酸2-ヒドロキシエチル (HEMA) を併用すると微粒子の水溶性を向上させることができ、例えば、スチレンを併用すると微粒子に屈折率の向上した特性を付与することができる。

10 こうして得られる微小粒子（またはミクロスフェア）は、再現性よく容易に作製でき、主としてシエル領域を構成するか、またはコアからの複数のブラシを構成するPEGの特性とその末端に存在する官能基を利用することにより、それ自体既知の縮合または付加法により生物学的な特異結合を形成する構成員の一員の残基を共有結合することができる。

さらに本発明の架橋ポリマーの微小粒子は、その網目構造、さらには、三級アミノ基部分を介して、金、銀、銅等の自由電子金属、あるいは限定されるものでないが下記半導体、15 磁性体、またはシリカの超微粒子を内包した複合微小粒子として提供することができる。金、銀等の超微粒子が生物学的アッセイ系で標識として利用されていることは周知であり、また、ある種の半導体、限定されるものでないが、例えば、ZnS、CdSe、CdS、InP、InAs、CdTe、ZnSe、ZnTe等のナノ結晶またはそれらの複合体が有機色素に比べ、より優れた蛍光ラベルであることも知られている（例えば、Chan et al., 20 Science Vol. 281 (1998) 2016-2018; Mamedova et al., Nano Lett., Vol. 1 (2001) 282-286、参照）。したがって、本発明に従う微小粒子は、凝集反応によって形成した凝集物を隣接する他の粒子との相互作用によるエネルギー移動を介して識別することもできる。

25 本明細書で使用するところの「超微粒子」は、本発明の微小粒子内に内包される大きさのものをすべて包含するサイズの粒子を意味するが、例えば、半導体超微粒子の場合には、直径が1～20nmの範囲内にあることができる。例えば、これらの半導体超微粒子は半導体を構成する成分および／または粒径を選ぶことによって発光波長の異なる微小粒子を提供できる。

かような金属または半導体超微粒子を内包した微小粒子（またはミクロスフェアともい

う)は、本発明に従うミクロスフェアと金属または半導体超微粒子のゾルとを水性媒体中で混合攪拌することにより、作製することができる。また、半導体超微粒子を内包させるには、例えば、周期律表のⅡⅡB族またはⅢⅢB族の元素の塩化物等の水溶液を上記微小粒子の水溶液と混合攪拌して該元素を微小粒子に内包し、次いで例えば、ⅤⅡB族の元素とアルカリ金属との塩の水溶液または $H_2S$ と混合攪拌することにより、微小粒子内において、インサイチュー (in situ) で半導体を形成することによることもできる。

上述したブロック共重合体からの微小粒子の形成方法は、当該技術分野で周知の方法に従うことができ、また、無機物質の超微粒子を該微小粒子に内包させるには、例えば、国際公開 (WO) 第02/056020号パンフレットに記載の方法をそのまま、または若干修飾して使用すればよい。

こうして形成された、各種無機物質の超微粒子を内包していてもよいポリマーをベースとする微小粒子は、水溶液中で安定に分散され、そして微小粒子全体はコアの荷電性基に起因して正または負のわずかな電荷を帯びうる。このような微小粒子を適当なpHに調節した生物学的流体 (例えば、血清) に加えると、図1 (a) の概念図に示されるように、該微小粒子は、微小粒子の荷電と反対荷電を有する夾雑タンパク質等 (薄く塗りつぶした中位の円で表す) および微小粒子表面の生物学的な特異結合を形成する一員 (Yで表されている) と特異結合する被検体 (黒で塗りつぶした小さな円で表す) を瞬時に結合または吸着する (なお、通常、これらの結合は微小粒子間の凝集物の形成をもたらす)。次いで、かような系に塩を添加すると、図1 (b) の概念図に示されるように、特異結合のみを残存させることができる。

図1 (a) に示すようなタンパク質および被検体の結合または吸着のための条件は、使用する微小粒子の荷電性基の種類、夾雑タンパク質等の種類によって変動するので、当業者は、被検体の正式な検出試験を実施する前に、予め、小企規の予備試験を行って、最適条件を選定するのが望ましい。しかし、荷電性基が三級アミノ基である場合、通常、生物学的流体のpHを、6.5～10.0に調節することにより、上記の結合または吸着を引き起こすことができる。このような結合または吸着は瞬時に起こる。次に、かような結合または吸着の中から被検体の特異結合のみを残す (生物学的な特異結合は開裂しないが、静電的相互作用による結合は開裂する) 条件も、上記のような小企規の予備試験を行って、最適条件を選定するのが望ましい。しかし、荷電性基が三級アミノ基である場合、通常、

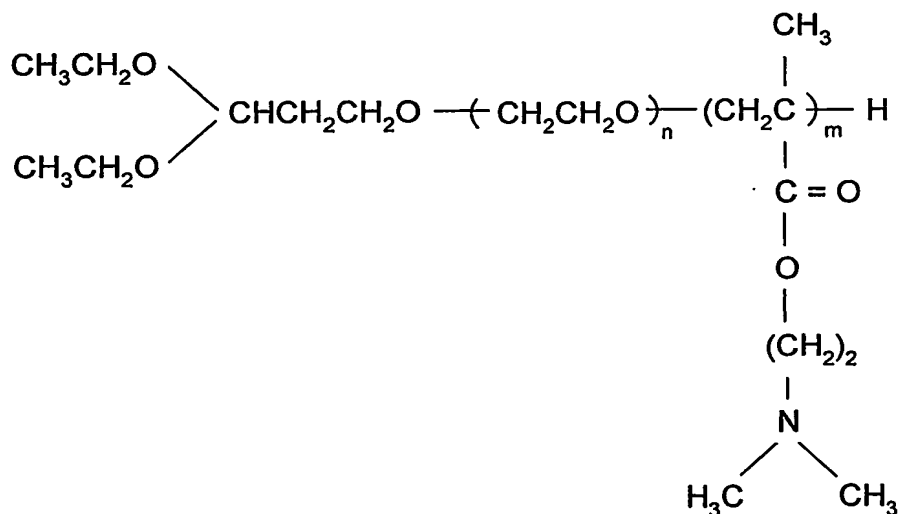
塩 ( $\text{NaCl}$ 、 $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 、 $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 等) の濃度を  $0.1 \sim 2\text{M}$  に調節することにより、静電相互作用を弱め、夾雑タンパク質の結合を開裂することができる。こうして夾雑タンパク質は微小粒子から脱離し、被検体の結合のみを選択的に残すことができる。この脱離または解凝集を瞬時に完了しうるので、本発明によれば、数十ナノメートルサイズの微小粒子を用いた場合でも、秒単位での被検体の検出ができる。また、以上の工程は、被検体の性質に応じて、室温、または生物学的流体が凍らない低温から  $80^\circ\text{C}$  までの温度で実施できる。

検出には、例えば、図 1 (a) の結合または吸着が起こった状態と図 1 (b) の選択的な脱離または解凝集が起こった状態を識別できる方法であれば、いかなる方法を用いてもよい。一般には、微小粒子の濁度の変化または微小粒子が特定の半導体超微粒子を内包している場合には、それらの超微粒子間の蛍光エネルギー移動 (FRET) の変化を利用して、図 1 (a) で示されるような状態と図 1 (b) で示されるような状態を識別できる。こうして、前記の変化量は、被検体が生物学的流体に存在する量に比例するので、被検体の存在の指標としうる。

以下、具体例を挙げて本発明をさらに具体的に説明するが、本発明をこれらに限定することを意図するものでない。当業者にとって、本発明に内包されるいずれの態様も、上記の本発明についての記述に照らして、以下の例を参照すれば、容易に理解できるであろう。

製造例 1： ブロック共重合体 ( $\text{PEG}/\text{PAMA} = 5000/14000$ ) の脱保護、これを用いた CdS 内包微小粒子の調製

この製造例では、重合体 (下記式で示される  $\alpha\text{-acetal-PEG-PAMA}$ ) :



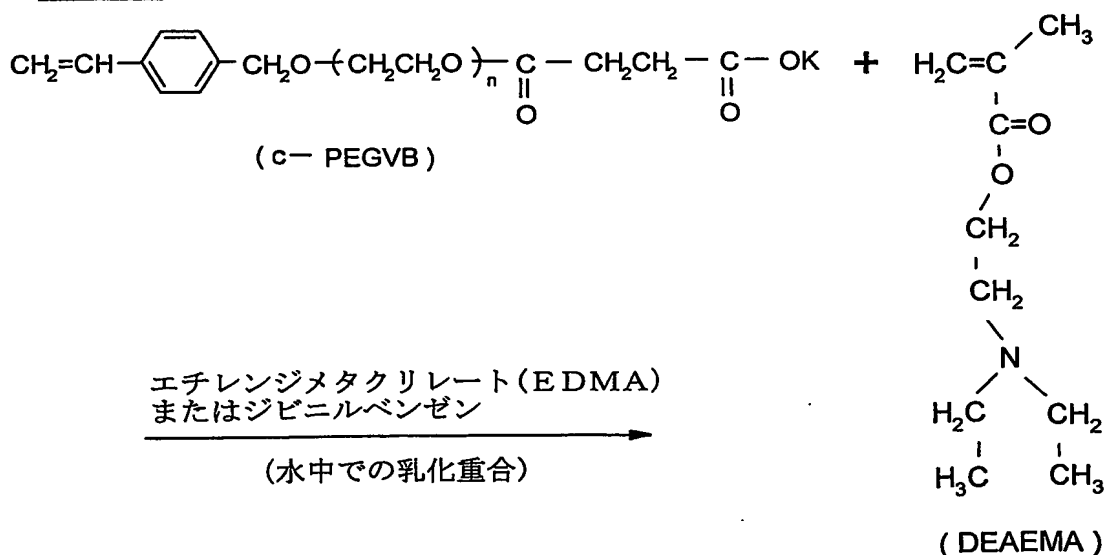
(上述の Kataoka et al., Macromolecules 1999, 32, 6892-6894 に記載の方法に従って得られた。PEG Mw=5000 g/mol、PAMA (ポリ [(2-N, N-ジメチルアミノ) エチルメタクリレート]) Mw=14,000) の 0.5 g に酢酸水溶液 22 ml を加え、35℃で5時間攪拌し末端のアセタール基をアルデヒド基 (ホルミル)

5 に変換した。反応後、10M NaOH の 37.4 ml を用いて中和し、ビオチンヒドラジド (PIERCE 社製) の  $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol}$  (0.038 g) を加え2時間攪拌し反応させた。この溶液に  $\text{NaBH}_4$  を  $2.6 \times 10^{-4} \text{ mol}$  加えて還元した後、未反応のビオチン、 $\text{NaBH}_4$  を除去するため1日間水透析を行った (水交換3回)。透析終了後、凍結乾燥によりポリマーを回収し、 $^1\text{H-NMR}$  測定を行い、ビオチンの導入を確認した。

10 バイアルに超純水 8 ml、前記で調製したビオチン-PEG-PAMA ブロック共重合体  $2.465 \times 10^{-6} \text{ mol}$  (0.048 g) を入れ、30分間攪拌し溶解させた。その後、スターラーで攪拌中に  $\text{CdCl}_2$  溶液、 $\text{Na}_2\text{S}$  溶液 (それぞれ  $2.0 \times 10^{-5} \text{ mol}$ ) を順に添加し、1時間攪拌を行った。サンプルは暗所で保管し、1日後、蛍光スペクトル測定を行った。

15 こうして得られた微小粒子 (ビオチン化 PEG-b-PAMA-CdS ナノ粒子ともいう) について、LEZA-600 (大塚電子社) によって表面ゼータ電位を測定したところ、 $\text{pH}=7$  以下で正の電荷を示した (微小粒子の水溶液を  $0.5 \text{ mg/ml}$  となるように希釈)。

#### 製造例 2 : 有機ナノ粒子ゲルの調製



微小粒子を製造する際、ポリエチレングリコールマクロモノマー（c-PEGVB）と N,N-ジエチルアミノエチルメタクリレート（DEAEMA）の重量比を 1/0.5～1/100 の範囲で変化させ、c-PEGVB-p（DEAEMA-EDMA）の製造を行った。各々の仕込み量は、c-PEGVB と DEAEMA の合計で 0.75 g、EDMA の添加量はモル比で 1/（c-PEGVB+DEAEMA）、過硫酸カリウム（KPS）添加量はモル比で 1/（c-PEGVB+DEAEMA+EDMA）、水 15 ml とした。これらの製造条件を下記表 1 に示す。

表 1 c-PEGVB-p（DEAEMA-EDMA）の合成条件

試行番号	c-PEGVB/DEAEMA		添加量 (mg)			
	モル比	重量比	c-PEGVB	DEAEMA	EDMA	KPS
1	1/0.5	1/4.8	500	250	3.2	4.5
2	1/1	1/9.6	375	375	4.4	6.1
3	1/2	1/19	250	500	5.6	7.7
4	1/4	1/39	150	600	6.6	9.1
5	1/8	1/78	83	667	6.9	9.9
6	1/50	1/486	15	735	7.9	10.9
7	1/100	1/971	7	743	8.0	11.0

具体的には、反応容器に c-PEGVB [ $\alpha$ -ビニルベンジルー  $\omega$ -カルボキシルポリエチレングリコール（ポリエチレングリコールマクロモノマーの数平均分子量 1800）] 0.15 g、KPS 9.1 mg 及び水 15 ml を加え、攪拌溶解した。この反応容器をアスピレーターにより脱気を行った。更に、シリンジ操作により EDMA 6.6  $\mu$ l、DEAEMA 650  $\mu$ l をポリエチレングリコールマクロモノマー/KPS 水溶液に加え、室温で 30 分間攪拌した後、60℃に昇温し 24 時間攪拌した。24 時間反応後、反応混合物の GC 測定を行い。未反応の DEAEMA 及び EDMA が消失している事を確認した。得られた重合物を濾過操作により不溶物を除き、c-PEGVB-p（DEAEMA-EDMA）の微小粒子（ナノスフェア）水溶液を得た。

各々の合成条件により得られたナノスフェアの粒径及び粒径分布を、DLS を用いて測定した。結果を下記の表 2 に示す。

表2 c-PEGVB-p(DEAEMA-EDMA)の合成結果

試行番号	平均粒径 (nm)	$\mu/\Gamma^2$
1	49.5	0.230
2	46.5	0.140
3	55.2	0.0940
4	62.9	0.0438
5	82.3	0.0881
6	196	0.0926
7	341	0.0206

## 製造例3：c-PEGVB-p (DEAEMA-DVB) の製造

- 5 ナノスフェアを調製する際、c-PEGVBの分子量を1800～7300の範囲で変化させc-PEGVB-p (DEAEMA-DVB) の合成を行った。各々の仕込み量は、c-PEGVBとDEAEMAの合計で0.75g、ジビニルベンゼン (DVB) の添加量はモル比で1/(c-PEGVB+DEAEMA)、KPS添加量はモル比で1/(c-PEGVB+DEAEMA+DVB)、水15mlとして行った。この製造条件を下記の表3
- 10 に示す。

表3 c-PEGVB-p(DEAEMA-EDMA)の合成条件

試行番号	PEG	c-PEGVB/DEAEMA		添加量 (mg)			
	分子量	モル比	重量比	c-PEGVB	DEAEMA	DVB	KPS
1	1800	1/4	1/39	150	600	4.3	9.1
2	4200	1/20	1/453	36	714	5.0	10.5
3	7300	1/10	1/394	68	682	4.8	10.1

- 具体的には、反応容器にc-PEGVB (数平均分子量1800) 0.15g、KPS 9.1mg及び水15mlを加え、攪拌溶解した。この反応容器をアスピレーターにより脱気を行った。更に、シリンジ操作によりDVB 4.8 $\mu$ l、DEAEMA 650 $\mu$ lをポリエチレングリコールマクロモノマー/KPS水溶液に加え、室温で30分間攪拌した後、60℃に昇温し24時間攪拌した。24時間反応後、反応混合物のGC測定を行い。未反応のDEAEMA及びDVBが消失している事を確認した。得られた重合物を濾過操作により不溶物を除き、c-PEGVB-p (DEAEMA-DVB) ナノスフェア水溶液を得た。
- 20

得られたナノスフェアについて実施例3と同様の評価を行い、結果を下記の表4に示す。

表4 c-PEGVB-p(DEAEMA-EDMA)の合成結果

試行番号	平均粒径 (nm)	$\mu/\Gamma^2$
1	65.0	0.064
2	52.0	0.078
3	56.0	0.093

- 5 上記の製造例3に従って製造したc-PEGVB-p (DEAEMA-DVB)の試行番号1、2および3のナノスフェアについてLEZA-600 (大塚電子社)によって、ゼータ電位を測定した。より具体的には、それぞれのナノスフェア水溶液を0.5mg/mlとなるように希釈し、NaClを加えて $1=1.0 \times 10^{-2}$ に調整した。 $1.0 \times 10^{-2}$ N-HClもしくは $1.0 \times 10^{-2}$ N-NaOH水溶液を加えることによりpHを2~10に調節し、粒子の表面ゼータ電位の測定を行った。いずれも、pH=7以上で正の電荷を示した。

#### 実施例1

- この実施例では、上記の製造例1に従って得られるビオチン化PEG-b-PAMA-CdSを含有する溶液にテキサスレッドストレプトアビジン(Tex SAともいう)を添加した場合とテキサスレッドウシ血清アルブミン(BSA)を添加した場合において、それぞれの添加溶液にNaClを添加し、その後のエネルギー移動度を観察する。各試料の濃度は次のとおりである。

	CdS [( $\times 10^{-5}$ )mol/l]	Tex SA [( $\times 10^{-5}$ )mol/l]	NaCl (mol/l)
時間0のサンプル	191	2.95	0
NaClを添加したサンプル	191	2.95	0.15

#### 20 エネルギー移動度へのNaCl添加効果

超遠心による精製後のビオチン化PEG-b-CdSナノ粒子溶液を8倍希釈し、そのうち0.5mlを各エッペンドルフチューブにとり、Tex SA (Texas Red BSAは発光強度が等しくなるように予め調整したもの) 溶液を各26μl添加した。ピペ



ッティングでよく混合した後、0.5 ml を分取し、石英マイクロセルを用いて蛍光スペクトルを測定した。そこにNaCl水溶液(3.3 mol/l)を0.05 ml 添加し、直後より経時的に蛍光スペクトル測定を行った(最終的な濃度はCdS;  $1.90 \times 10^{-3}$  mol/l、Tex-SA;  $2.9 \times 10^{-5}$  mol/l)。結果を図2に示す。

- 5 図2から、pH=7.4でビオチン化-PEG-CdSナノ粒子とTex SAあるいはTex-BSAを混合させると瞬間的に620 nmの発光が確認される。NaCl 添加後、10%程度の体積増加があるため、Tex SAの系では発光強度も10%程度減少している。一方で、Tex-BSAの系ではSAと比べて明らかに発光の減少が確認された。イオン強度に応じて発光強度の減少幅も大きくなっていることから、電荷の中和による静電
- 10 相互作用を介した非特異吸着が抑制されたものと判断できる。このようにこれらの操作に於いて、数秒程度の混合時間で分子認識が定量できる。

#### 産業上の利用分野

本発明に従えば、数秒程度の混合時間で生物学的な特異結合を形成するいずれかの一員の分子が、微小粒子の凝集反応を介して提出できるので、医療診断業等で利用できる。

## 請求の範囲

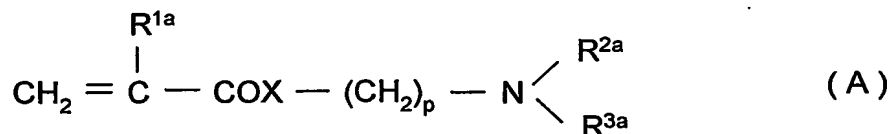
1. 水性溶液中に分散したポリマーをベースとする微小粒子の凝集反応を利用する該溶液中の被検体の検出方法であって、

- 5 (a) 該微小粒子が荷電性基を担持した反復単位を含有するポリマー鎖セグメントをコアとし、そして非イオン性の親水性ポリマー鎖もしくは該親水性ポリマー鎖セグメントを前記コアの上の複数ブラシまたはシエルとし、かつ、該親水性ポリマー鎖の自由末端の少なくとも一部に被検体と生物学的な特異結合を形成する構成員の一員の残基が共有結合されており、そして
- 10 (b) 凝集反応を、荷電性基が荷電した状態の微小粒子が被検体を介して凝集し得る条件下で行い、次いで該微小粒子の凝集物における微小粒子間の生物学的な特異結合は開裂しないが、静電的相互作用による結合は開裂しうる条件下で該凝集物を処理し、
- (c) 工程 (b) の処理後に残存する凝集物の存在を被検体の存在の指標とする、ことを特徴とする検出方法。

- 15 2. ポリマーをベースとする微小粒子中の荷電性基が三級アミノ基、二級アミノ基、カルボキシル基、スルホ基およびホスホノ基からなる群より選ばれる請求項 1 に記載の方法。

3. ポリマーをベースとする微小粒子中の非イオン性の親水性ポリマー鎖がポリエチレングリコール、ポリ (ビニルアルコール)、ポリ (ビニルピロリドン) およびポリ (N,N-ジメチルアクリルアミド) からなる群より選ばれるポリマーに由来し；そして

- 20 ポリマーをベースとする微小粒子中の荷電性基を担持したポリマー鎖が、一般式 (A) :

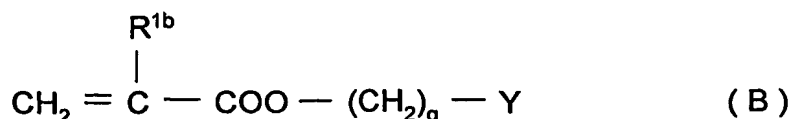


[式中、 $\text{R}^{1a}$ は水素原子または $\text{C}_{1-6}$ アルキル基を表し、 $\text{R}^{2a}$ および $\text{R}^{3a}$ は独立して $\text{C}_{1-6}$ アルキル基を表すか、または $\text{R}^{2a}$ および $\text{R}^{3a}$ は、それらが結合する窒素原子と一緒にあって、さらなる窒素原子1もしくは2個、酸素または硫黄原子1個を含んでもよい5

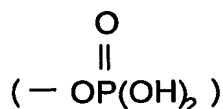
25 もしくは6員の複素環を形成してもよく、

Xは $-\text{O}-$ または $-\text{NH}-$ を表し、そして

pは2～6の整数である。] で表されるモノマー、または一般式 (B) :



[式中、 $\text{R}^{1b}$ は水素原子または $\text{C}_{1-6}$ アルキル基を表し、 $\text{Y}$ はカルボキシル( $-\text{COOH}$ )、スルホ( $-\text{SO}_3\text{H}$ )、オキシスルホ( $-\text{OSO}_3\text{H}$ )またはオキシホスホノ



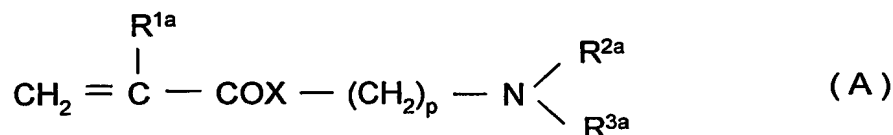
5 を表し、そして

$q$ は0～4の整数であるが、 $q$ が0の場合には、 $\text{Y}$ は水素原子を表す。]で表されるモノマーに由来するか；あるいは

ポリ(リシン)、ポリ(アスパラギン酸3- $\omega$ -N,N-ジ $\text{C}_{1-6}$ アルキルアミノ- $\text{C}_{2-4}$ アルキル)、ポリ(グルタミン酸4- $\omega$ -N,N-ジ $\text{C}_{1-6}$ アルキルアミノ- $\text{C}_{2-4}$ アルキル)、

10 ポリ(アスパラギン酸)およびポリ(グルタミン酸)からなる群より選ばれるポリマーに由来する、請求項1に記載の方法。

4. ポリマーをベースとする微小粒子中の親水性ポリマー鎖がポリエチレングリコールに由来し、そして荷電性基を担持した反復単位を含有するポリマー鎖が、一般式(A)：



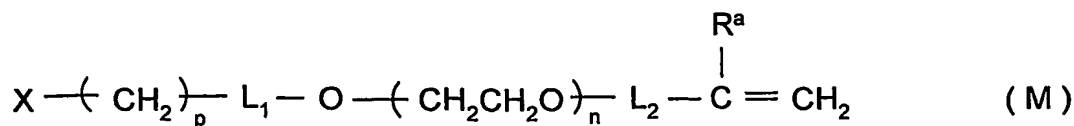
15 [式中、 $\text{R}^{1a}$ は水素原子または $\text{C}_{1-6}$ アルキル基を表し、 $\text{R}^{2a}$ および $\text{R}^{3a}$ は独立して $\text{C}_{1-6}$ アルキル基を表すか、または $\text{R}^{2a}$ および $\text{R}^{3a}$ は、それらが結合する窒素原子と一緒にあって、さらなる窒素原子1もしくは2個、酸素または硫黄原子1個を含んでもよい5もしくは6員の複素環を形成してもよく、

$\text{X}$ は $-\text{O}-$ または $-\text{NH}-$ を表し、そして

20  $p$ は2～6の整数である。]で表されるモノマーに由来する請求項1に記載の方法。

5. ポリマーをベースとする微小粒子中の親水性ポリマー鎖セグメントと荷電性基を担持した反復単位を含有するポリマー鎖セグメントがブロック共重合体を構成する請求項4に記載の方法。

6. ポリマーをベースとする微小粒子中の親水性ポリマー鎖が、一般式 (M) :



[式中、Xは水素原子、 $-\text{COOZ}$ 基（ここで、Zは水素原子または有機基を表す）、 $-\text{CHR}^1\text{R}^2$ （ここで、 $\text{R}^1$ および $\text{R}^2$ は、独立して、 $\text{C}_{1-6}$ アルキルオキシ基、フェニルオキシ基もしくはフェニル- $\text{C}_{1-3}$ アルキルオキシ基を表すか、または $\text{R}^1$ および $\text{R}^2$ は一緒になって $-\text{OCHR}'-\text{CH}_2\text{O}-$ であって、 $\text{R}'$ が水素原子もしくは $\text{C}_{1-6}$ アルキル基である基を表す）または $-\text{CH}=\text{O}$ を表し、

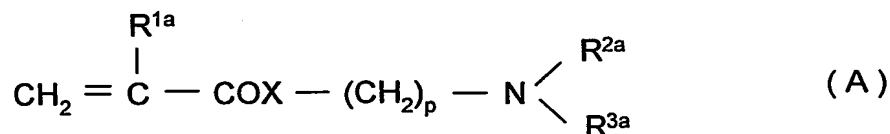
R<sup>a</sup>は水素原子またはC<sub>1-6</sub>アルキル基を表し、

$L_1$ はメチレン基またはカルボニル基を表し、

10 L<sub>2</sub>はカルボニル基、C<sub>1-3</sub>アルキレン基またはC<sub>1-3</sub>アルキルフェニレン基を表し、

$n$ は2~10,000の整数であり、そして

pは1～5の整数である] で表されるポリ（エチレングリコール）マクロモノマーから形成され、そしてポリマーをベースとする微小粒子中の荷電性基を担持した反復単位を含有するポリマー鎖が、一般式（A）：



15

[式中、R<sup>1a</sup>は水素原子またはC<sub>1-6</sub>アルキル基を表し、R<sup>2a</sup>およびR<sup>3a</sup>は独立してC<sub>1-6</sub>アルキル基を表すか、またはR<sup>2a</sup>およびR<sup>3a</sup>は、それらが結合する窒素原子と一緒になって、さらなる窒素原子1もしくは2個、酸素または硫黄原子1個を含んでもよい5もしくは6員の複素環を形成してもよく、

20 Xは—O—または—NH—を表し、そして

pは2～6の整数である。] で表されるモノマーから形成され、かつ

上記2種のモノマーは、場合によって混合されていてもよい架橋剤および／またはエチレン性重合性基を有する希釈モノマーとともに共重合させたランダム共重合体を形成するものである、請求項4に記載の方法。

25 7. ポリマーをベースとする微小粒子が、それらのコア領域に半導体、自由電子金属、

磁性体およびシリカからなる群から選ばれる無機物の超微粒子が内包されているものである請求項 1 ～ 6 のいずれかの一つに記載の方法。

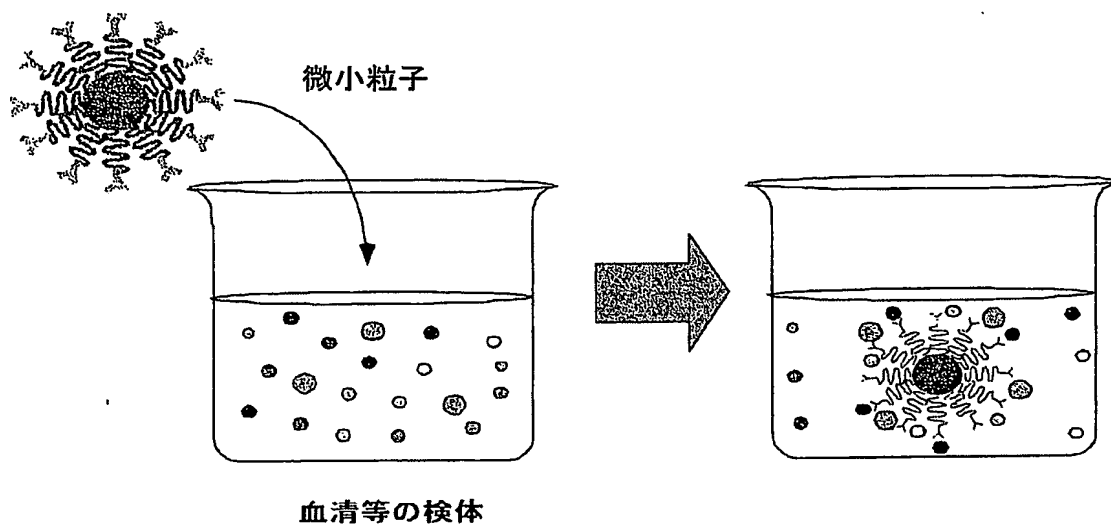
8. ポリマーをベースとする微小粒子が、それらのコア領域に半導体の超微粒子が内包されているものである請求項 4 に記載の方法。

- 5 9. 生物学的な特異結合を形成する構成員の一員の残基が抗体とその抗原もしくはハプテンのいずれかの残基、受容体タンパク質とそれに結合するレクチン、ホルモン、神経伝達物質のいずれかの残基、ストレプトアビシンとビオチン誘導体のいずれかの残基、酸素とその基質のいずれかの残基である請求項 1 ～ 8 のいずれかの一つに記載の方法。

- 10 10. 生物学的な特異結合は開裂しないが、静電的相互作用による結合は開裂しうる条件が高塩濃度下に凝集物が置かれる請求項 1 ～ 7 のいずれかの一つに記載の方法。

Fig. 1

(a)



(b)

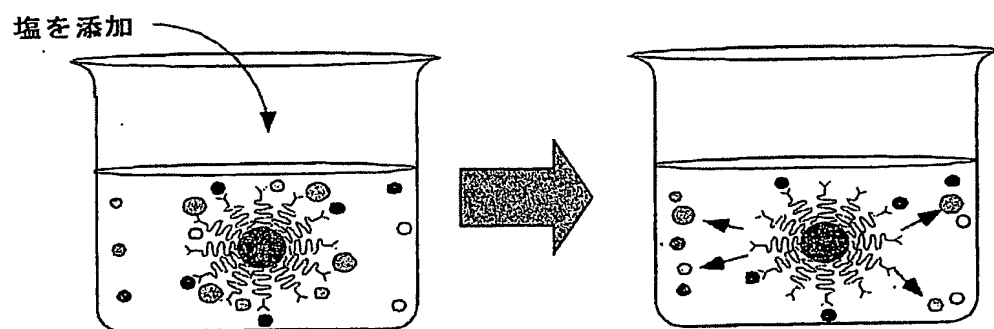
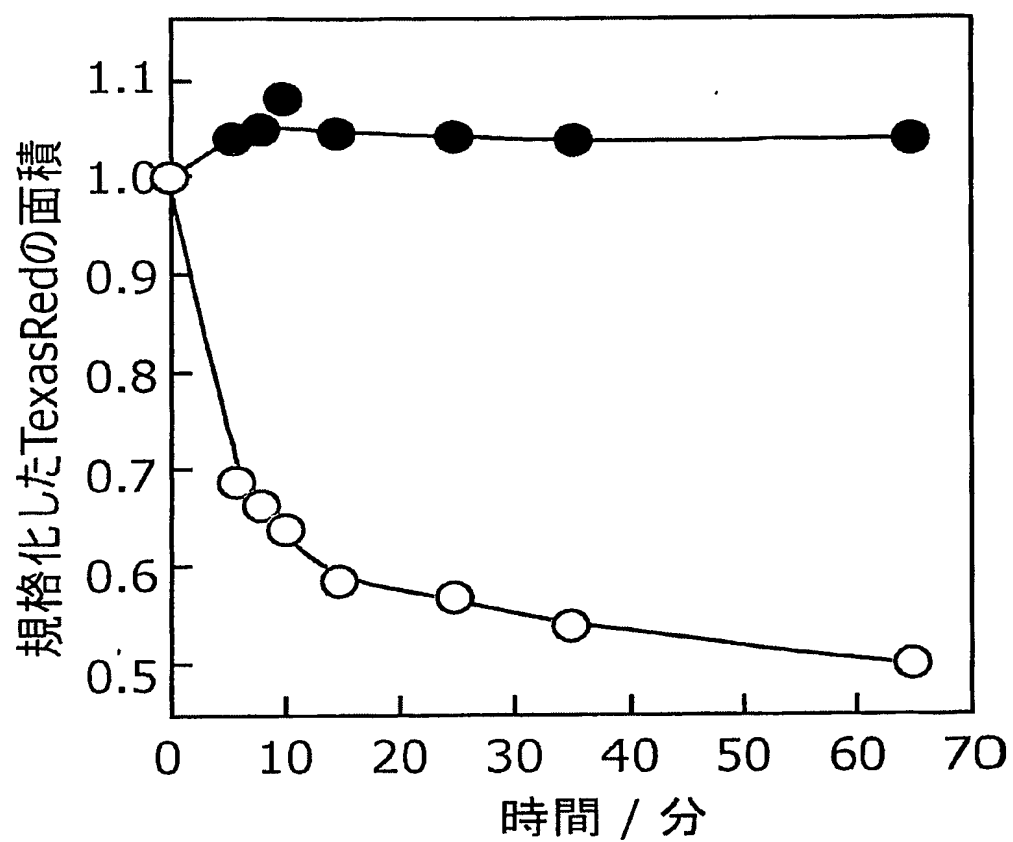


Fig. 2



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/013258

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
Int.Cl<sup>7</sup> G01N33/543

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
Int.Cl<sup>7</sup> G01N33/53-579Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched  
Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2004  
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2004 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2004

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2001-208754 A (Kazunori KATAOKA), 03 August, 2001 (03.08.01), & US 2003/013133 A & WO 2001/55722 A	1-10
A	JP 2001-324507 A (Nano Carrier Co., Ltd.), 22 November, 2001 (22.11.01), & WO 2001/88541 A	1-10
A	JP 2001-146556 A (Nano Carrier Co., Ltd.), 29 May, 2001 (29.05.01), & WO 2001/37879 A & EP 1230934 A	1-10

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
13 October, 2004 (13.10.04)Date of mailing of the international search report  
02 November, 2004 (02.11.04)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/013258

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2002/097436 A (Mitsubishi Kagaku Iatron, Inc.), 05 December, 2002 (05.12.02), & EP 1398635 A	1-10
A	JP 07-083928 A (Masao KARUBE), 31 March, 1995 (31.03.95), (Family: none)	1-10

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> G01N33/543

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> G01N33/53-579

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2004年
日本国登録実用新案公報	1994-2004年
日本国実用新案登録公報	1996-2004年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP 2001-208754 A (片岡一則) 2001.08.03 & US 2003/013133 A & WO 2001/55722 A	1-10
A	JP 2001-324507 A (ナノキャリア株式会社) 2001.11.22 & WO 2001/88541 A	1-10
A	JP 2001-146556 A (ナノキャリア株式会社) 2001.05.29 & WO 2001/37879 A & EP 1230934 A	1-10

☒ C欄の続きにも文献が列举されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

13.10.2004

国際調査報告の発送日

0211.2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

山村 祥子

2J

9217

電話番号 03-3581-1101 内線 3251

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	WO 2002/097436 A (株式会社三菱化学ヤトロン) 2002. 12. 05 & EP 1398635 A	1-10
A	JP 07-083928 A (軽部征夫) 1995. 03. 31 (ファミリーなし)	1-10